



Synergistic Antimicrobial Effect of *Lactobacillus plantarum* with Extracts of *Satureia hortensis* and *Anethum geravolens* on *Salmonella typhimurium*; *in vitro* and in Animal Model

ARTICLE INFO

Article Type

Research Article

Authors

Tizfahm Tikmehdash H.¹ MSc,
Nasiri Semnani Sh.* PhD,
Tajabadi Ebrahimi M.² PhD,
Alizadeh H.³ MSc,
Javadzade Y.⁴ PhD,
Hamed Yazdan S.⁵ PhD

*Biology Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

¹Biology Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

²Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

³Young Researchers & Elite Club, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

⁴Department of Pharmaceutics, Pharmacy Faculty, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

⁵Department of Pharmacognosy, Pharmacy Faculty, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Correspondence

Address: Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences & Medicine, Islamic Azad University, Moallem Street, Zanjan, Iran.

Phone: +982414265890

Fax: +982414265890
sh.nasiri92@yahoo.com

Article History

Received: December 12, 2011

Accepted: June 18, 2013

ePublished: June 25, 2013

ABSTRACT

Aims Gastroenteritis caused by *Salmonella typhimurium* and the treatment of this disease with antibiotics follows by problems such as drug resistance and side effects emergence. Using herbs and probiotics can be a solution to this problem. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effect of *Lactobacillus plantarum* with extracts of *Satureia hortensis* and *Anethum geravolens* on *Salmonella typhimurium*; *in vitro* and in animal model.

Methods In this experimental study, 35 female mice 6 to 8 weeks old were divided into 7 groups of 5. The mice infected with appropriate strains of *Salmonella typhimurium*. After extraction of *Satureia hortensis* and *Anethum geravolens*, antibacterial effect on *Salmonella typhimurium* was studied *in vitro*. Antibacterial activity of 5 strains of *Lactobacillus plantarum* that showed the highest amount of exopolysaccharide production studied on *Salmonella typhimurium*. Mice were treated with oral and growths of *Salmonella typhimurium* in their feces were assessed. The results were analyzed by one-way ANOVA test in SPSS 18 software.

Results Mice which treated with ethanolic extract of *Satureia hortensis* alone and in combination with probiotic showed significant decrease in the rate of excretion and colonization of *Salmonella typhimurium* in comparison with mice that treated with ethanolic extract of *Anethum geravolens* alone and in combination with neutralize probiotic and control groups.

Conclusion Ethanolic extract of *Satureia hortensis* has a synergistic effect on antimicrobial effect of *Lactobacillus plantarum* neutralized supernatant against *Salmonella typhimurium*.

Keywords Probiotics; *Salmonella typhimurium*; *Lactobacillus plantarum*; *Satureia hortensis* extract; *Anethum geravolens* extract

CITATION LINKS

[1] Etiology of bloody diarrhea ... [2] Population, based, surveillance ... [3] Shigella and Salmonella contamination ... [4] Occurrence and distribution of... [5] Probiotics, prebiotics and synbiotics ... [6] Review potential of probiotics as ... [7] Bergey's manual of systematic ... [8] The effects of probiotics ... [9] Immune system stimulation by ... [10] Probiotic and fermented food... [11] Probiotics, immune function, ... [12] Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides... [13] Adipic acid: Handbook of ... [14] Biosynthesis and applications ... [15] Potential of probiotics as ... [16] Selection of probiotic strains ... [17] Probiotics as modulators of the... [18] Microbial antagonists of food borne... [19] Essential oil of *Saturejabachtiarica* ... [20] Comparison of oil content and .. [21] Chemical constituent's .. [22] Effect of *Zataria multiflora*: Essential ... [23] Characterization of bacteriocin ... [24] Antimicrobial activity ... [25] Antimicrobial activity of ... [26] Antioxidant and free ... [27] Antagonistic activity ... [28] Selection of a potential probiotic ... [29] An overview of probiotics, prebiotics ... [30] Inhibitory effect of fluvastatin on ... [31] Effective control of ... [32] Study on probiotic properties of ... [33] Antimicrobial activity of .. [34] Molecular population genetics ... [35] Effects of probiotic bacteria ... [36] Case-control study of infections ... [37] Probiotic microorganism: How... [38] The *in vitro* inhibition of ... [39] Antimutagenic activity of milk ... [40] Influence of yogurt and ... [41] Bioenergetics consequences of nisin ... [42] Practical microbiology and... [43] The *in vivo* inhibition of Gram-negative ...

هم‌افزایی اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس پلانتاروم با عصاره‌های مرزه و شوید بر سالمونلا تیفی‌موریوم؛ در شیشه و در مدل حیوانی

حسن تیزفهم تکمه‌داس MSc

مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

شهرزاد نصیری سمنانی PhD*

مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

مریم تاج‌آبادی ابراهیمی PhD

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

حامد علیزاده MSc

باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

یوسف جوادزاده PhD

گروه داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

ساناز حامدیزدان PhD

گروه فارماکوتوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

اهداف: سالمونلا تیفی‌موریوم عامل بیماری گاستروانتریت است که درمان آن با آنتی‌بیوتیک‌ها مشکلاتی مانند مقاومت دارویی و بروز عوارض جانبی را به دنبال دارد. استفاده از گیاهان دارویی و پروبیوتیک‌ها می‌تواند راه حل این مشکل باشد. این پژوهش با هدف بررسی فعالیت ضد میکروبی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم و عصاره گیاهان دارویی مرزه و شوید به صورت جداگانه و توأم بر سالمونلا تیفی‌موریوم در مدل آزمایشگاهی و حیوانی صورت گرفت.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی، از ۳۵ سر موش ماده BALB/c ۸- هفته‌ای در ۷ گروه ۵ تایی استفاده شد. موش‌ها با استفاده از سوش مناسب سالمونلا تیفی‌موریوم مبتلا به عفونت شدند. پس از عصاره‌گیری از شوید و مرزه، اثر ضدباکتریایی آنها در شیشه بر سالمونلا تیفی‌موریوم بررسی شد. اثر ضدباکتریایی ۵ سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم که بالاترین تولید آگروپلی‌ساکارید را داشتند بر رشد سالمونلا تیفی‌موریوم بررسی شد. موش‌ها با مصرف خوراکی تیمار شده و میزان سالمونلا تیفی‌موریوم در مدفوع آنها مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها با نرم‌افزار SPSS 18 و آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه تحلیل شدند.

یافته‌ها: موش‌هایی که با عصاره اتانولی مرزه به‌تنهایی و توأم با سوپرناتانت خنثی پروبیوتیک تیمار شده بودند نسبت به موش‌هایی که با عصاره اتانولی شوید به‌تنهایی و توأم با عصاره خنثی پروبیوتیک تیمار شده بودند و گروه کنترل، کاهش معنی‌داری در میزان دفع و کلونیزاسیون سالمونلا تیفی‌موریوم داشتند.

نتیجه‌گیری: عصاره اتانولی مرزه تاثیر هم‌افزایی بر اثر ضد میکروبی سوپرناتانت خنثی لاکتوباسیلوس پلانتاروم علیه سالمونلا تیفی‌موریوم دارد.

کلیدواژه‌ها: پروبیوتیک، سالمونلا تیفی‌موریوم، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، عصاره مرزه، عصاره شوید

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۹/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۲۸

* نویسنده مسئول: sh.nasiri92@yahoo.com

مقدمه

بیماری‌های حاد دستگاه گوارش در سراسر جهان، از مهم‌ترین بیماری‌ها هستند. سالمونلا تیفی‌موریوم باسیل گرم‌منفی، هوازی یا بی‌هوازی اختیاری، به ابعاد ۰/۵-۳ میکرون، فاقد اسپور، متحرک و دارای فلاژل پری‌تریش از شایع‌ترین عوامل باکتریایی در عفونت‌های گوارشی و به عنوان رایج‌ترین عامل سالمونلوزیس به شمار می‌رود [۴-۱]. تغییر فلور بی‌هوازی روده‌ای با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، میزان را بیشتر در معرض عفونت‌های سالمونلایی قرار می‌دهد. مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان و پیش‌گیری از عفونت‌های ذکر شده، نه تنها باعث ایجاد مقاومت دارویی در آنها می‌شود، بلکه سبب به‌هم‌خوردن فلور نرمال مفید دستگاه گوارش شده و بدن را مستعد ابتلا به انواع بیماری‌های روده‌ای مثل اسهال می‌نماید. باکتری‌های پروبیوتیک با توانایی تغییر فلور میکروبی روده، نقش مهمی به عنوان باکتری‌های مفید در بدن ایفا می‌کنند. شواهد زیادی مبنی بر توان میکروارگانسیم‌های پروبیوتیک در حفظ فلور میکروبی مطلوب روده و اثرات درمانی آنها وجود دارد. مصرف خوراکی پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانسیم‌هایی که در محیط زنده با عامل میکروبی پاتوژن مقابله می‌کنند، می‌توانند بدن را در برابر عوامل بیماری‌زا مصون نمایند [۴].

رایج‌ترین گونه‌های پروبیوتیک‌ها شامل لاکتوباسیلوس‌ها، ساکارومیسس‌ها، بیفیدوباکتریوم‌ها، انتروکوکوس‌ها و کلاستریدیم‌ها هستند [۵، ۶]. لاکتوباسیلوس‌ها باکتری‌های غیرپاتوژنی هستند که با کاهش pH محیط و تولید موادی مانند باکتریوسین، پراکسید هیدروژن، دی‌استیل، استالندید، آمونیاک و اسیدهای چرب آزاد می‌توانند اثر بازدارندگی روی رشد بسیاری از میکروارگانیزم‌ها داشته باشند [۷]. تغذیه با پروبیوتیک‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی منجر به تحریک ایمنی سلول‌ها می‌شود. این باکتری‌ها موجب افزایش تعداد گلبول‌های قرمز، لنفوسیت‌ها و فعالیت لیزوزیم شده و همانند واکسن‌های خوراکی عمل می‌نمایند [۸-۱۲]. پری‌بیوتیک‌ها قادرند ترکیب فلور میکروبی روده را بعد از یک دوره کوتاه تغذیه‌ای تغییر دهند. اثرات مثبت پری‌بیوتیک‌ها روی بهبود روند هضم (تشدید جذب مواد معدنی)، تقویت سیستم ایمنی، جذب کلسیم و سایر مواد معدنی، تنظیم pH و حرکات روده‌ای به اثبات رسیده است [۱۳، ۱۴]. مصرف پری‌بیوتیک‌ها علاوه بر تحریک و تقویت رشد و فعالیت پروبیوتیک‌ها در بدن، ممکن است مستقیماً اثرات سودمند و

گروه IV با عصاره الکی شوید، گروه V با عصاره خنثی سویه T14، گروه VI با عصاره الکی مرزه و عصاره خنثی سویه T14 و گروه VII با عصاره الکی شوید و عصاره خنثی سویه T14 تیمار شدند. پروتکل اخلاقی حقوق حیوانات آزمایشگاهی مورد تایید وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی در همه مراحل رعایت شد.

آماده‌سازی سوش باکتری برای ایجاد عفونت در

موش‌ها: سوش سالمونلا تیفی‌موریوم برای ایجاد عفونت در موش‌ها با کشت ۲۴ ساعته سویه میکروبی سالمونلا تیفی‌موریوم (ATCC ۱۴۰۲۸، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان؛ ایران) در محیط نوترینت‌براث با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند حاوی $10^8 \times 1/5$ باکتری در هر میلی‌لیتر تهیه و برای تعیین غلظت مورد استفاده، میزان جذب آن با کدورت‌سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۲۷]. ۰/۵ میلی‌لیتر از باکتری در روز اول به صورت خوراکی و سپس به مدت یک هفته هر ۸ ساعت، یک میلی‌لیتر از تیمارها با استفاده از سوزن گاوژ به موش‌ها ارائه شد [۲۸].

انتخاب نوع عصاره گیاهی برای تیمار: برگ‌های مرزه و شوید پس از جمع‌آوری (تیکمه‌دش، آذربایجان شرقی؛ ایران)، خشک و پودر شده و تا زمان عصاره‌گیری، در شیشه‌های مات نگهداری شدند. برای عصاره‌گیری، ۱۰۰ گرم از پودر هر گیاه با ۷۰۰ میلی‌لیتر حلال (آب‌مقطر، اتانول، استون) به مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه شیکر مخلوط و پس از صاف‌شدن با دستگاه تقطیر در خلاء، عصاره‌ها به میزان ۵۰ ml (آبی)، ۲۰ ml (اتانولی) و ۲۰ ml (استونی) غلیظ شدند. عصاره‌های تغلیظ‌شده با فیلتر میکروبی ۰/۴۵ میکرونی استریل و برای مصارف بعدی درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری استریل ریخته و در دمای 80°C نگهداری شدند [۲۹]. در هنگام مصرف، ۲ میلی‌لیتر از حجم نهایی عصاره‌ها با ۲ میلی‌لیتر DMSO حل شد. برای تعیین MIC و MBC عصاره‌های مرزه و شوید از روش ماکرودایلوشن استفاده شد. برای این منظور ابتدا غلظت‌های ۲۰۰ تا ۳/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ها در محیط مولر هینتون‌براث تهیه و یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی معادل با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند به آن افزوده و در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. از لوله شامل باکتری در محیط فاقد عصاره به عنوان کنترل مثبت استفاده شد [۲۷، ۳۰، ۳۱].

انتخاب سویه مناسب لاکتوباسیلوس پلانٹاروم برای

تیمار: از میان ۲۲ سویه لاکتوباسیلوس پلانٹاروم جدا شده از محصولات لبنی تخمیری (کلکسیون میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی؛ ایران)، ۵ سویه که بالاترین تولید اگزوپلی‌ساکارید را بعد از کشت در محیط لاکتوباسیلی MRS آگار برای ۴۸ ساعت در دمای 37°C و ۸٪ دی‌اکسیدکربن داشتند،

سلامت‌بخش نیز به همراه داشته باشند. مهم‌ترین پری‌بیوتیک‌های طبیعی شامل ترکیبات گیاهی فیتو (مانند اسیدفیتیک)، مالتودکسترین‌ها، اولیگوساکاریدها، پکتین، زایلان، لاکتیتول، استاکیز، رافینوز، گلوکوزیل ساکاروز، اسیدهای چرب غیراشباع لاکتوبیونیک‌اسید و فیبرهای رژیمی غلات و حبوبات (مانند همی‌سلولز، پنتوزان‌ها یا آرابینوزایلان‌ها و β -گلوکان‌ها) هستند [۱۵، ۱۶].

کاربرد هم‌زمان پری‌بیوتیک و پروبیوتیک (سین‌بیوتیک) با هدف به‌وجود آوردن هم‌افزایی در اثرات سلامت‌بخش آنها، تاثیر قابل ملاحظه‌ای در افزایش تولید مواد غذایی سین‌بیوتیک، به ویژه در غذای نوزادان و سالخوردگان داشته است [۱۷]. گیاهان دارویی به دلیل داشتن مقادیر زیادی از ترکیبات فرار آروماتیک، دارای خاصیت ضدکاسایی و ضد میکروبی بوده و به صورت یک جز عملگر، یک طعم‌دهنده و نیز به عنوان یک نگهدارنده در مواد غذایی عمل می‌کنند [۱۸].

مرزه (*Satureia hortensis* L.) از خانواده نعناع (Labiatae) بوده و با داشتن کارواکرونول در اسانس خواص ضدقارچی، ضد میکروبی، خلط‌آور، ضداسپاسم و ضداسهال دارد [۱۹، ۲۰]. شوید (*Anethum graveolens*) از خانواده چتریان (Umbelliferae) که غنی از ترکیبات فلاوونوئیدی (کوئرستین ۳-۰- بتا دی‌گلوکورونید و ایزورامنتین ۳-۰- بتا دی‌گلوکورونید) بوده و اثرات ضدقارچی و ضدباکتری دارد. مطالعات نشان می‌دهند که پروبیوتیک‌ها پس از مصرف به صورت خوراکی توسط اتصال به گیرنده‌ها، با پاتوزن‌هایی نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا*، *شیگلا*، *اشریشیا*، *انتروباکتر*، *ویبریولکرا* و *هلیکوباکتر پیلوری* رقابت نموده و می‌توانند از طریق ترکیب با عوامل ضد میکروبی مانند گیاهان اثر هم‌افزایی ایجاد کرده و مانع از اتصال و کلونیزاسیون این باکتری‌ها شوند [۲۶-۲۱].

این پژوهش با هدف بررسی فعالیت ضد میکروبی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانٹاروم و عصاره گیاهان دارویی مرزه و شوید به صورت جداگانه و توأم بر سالمونلا تیفی‌موریوم در مدل آزمایشگاهی و حیوانی صورت گرفت.

روش‌ها

در این مطالعه تجربی، از ۳۵ سر موش ماده BALB/c ۸- هفته‌ای (انستیتو پاستور کرج؛ ایران) در ۷ گروه ۵ تایی استفاده شد. پیش از شروع آزمایش، یک گرم مدفوع از هر موش برای تایید وجود یا عدم وجود آلودگی به سالمونلا تیفی‌موریوم نمونه‌برداری شد. موش‌های گروه I و II هیچ مداخله‌ای دریافت نکردند با این تفاوت که در گروه اول عفونت سالمونلایی ایجاد نشد ولی در گروه دوم عفونت سالمونلایی ایجاد شد. در ۵ گروه بعدی عفونت سالمونلایی ایجاد شد و موش‌های گروه III با عصاره الکی مرزه،

نسبت به عصاره‌های آبی و استونی اثر مهاری بیشتری بر رشد *سالمونلا تیفی‌موریوم* داشتند، در نتیجه عصاره‌های اتانولی گیاهان برای بررسی فعالیت ضد میکروبی بر *سالمونلا تیفی‌موریوم* انتخاب شد. سوپرناتانت خنثی سویه T14 و سوپرناتانت اسیدی سویه TD4 بیشترین مهار رشد *سالمونلا تیفی‌موریوم* را نسبت به سایر سوپرناتانت‌ها داشتند و سوپرناتانت خنثی T14 برای انجام فعالیت‌های ضد میکروبی به همراه عصاره‌های گیاهان انتخاب شد (جدول ۱).

جدول ۱ میزان جذب نوری سویه *سالمونلا تیفی‌موریوم* در ۳ غلظت مختلف از سوپرناتانت‌های اسیدی و خنثی ۵ سویه *لاکتوباسیلوس پلانتروم*

سویه	۱۵٪	۱۰٪	۵٪
Y2b4			
اسیدی	۰/۰۲۶	۰/۰۱۹	۰/۱۱۳
خنثی	۰/۴۴۳	۰/۳۹۱	۰/۳۶۰
C6i4			
اسیدی	۰/۳۵۷	۰/۳۱۲	۰/۳۲۸
خنثی	۰/۴۰۳	۰/۳۵۱	۰/۳۴۷
T14			
اسیدی	۰/۰۳۴	۰/۰۵۵	۰/۰۶۵
خنثی	۰/۲۸۸	۰/۱۶۹	۰/۲۶۲
TD4			
اسیدی	۰/۰۲۸	۰/۰۱۳	۰/۰۰۳
خنثی	۰/۲۸۷	۰/۳۰۹	۰/۲۵۱
TD10			
اسیدی	۰/۰۳۲	۰/۰۲۶	۰/۲۱۴
خنثی	۰/۴۱۰	۰/۴۸۱	۰/۳۸۶
کنترل	۰/۴۷۱	۰/۵۰۷	۰/۴۴۱

تاثیر توام سوپرناتانت خنثی *لاکتوباسیلوس پلانتروم* به همراه عصاره گیاه بر *سالمونلا تیفی‌موریوم* بیشتر از تاثیر هر کدام از عصاره‌ها و سوپرناتانت به تنهایی بر *سالمونلا تیفی‌موریوم* بود و عصاره اتانولی شوید و مرزه بر سوپرناتانت خنثی *لاکتوباسیلوس پلانتروم* اثر هم‌افزایی داشتند. افزایش درصد عصاره *لاکتوباسیلوس پلانتروم* باعث افزایش اثر هم‌افزایی تا محدوده غلظت ۵۰٪ شد و با افزایش بیشتر تاثیری بر اثر سینرژیستی مشاهده نشد.

انتخاب شدند [۳۲]. ۵ سویه *لاکتوباسیل*، به صورت جداگانه، در ۵ لوله محتوی ml۱۰ محیط MRS برات تلقیح و به مدت ۴۸-۷۲ ساعت در انکوباتور CO₂ دار در دمای ۳۷°C قرار داده شد؛ پس از سانتریفیوژ در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه، سوپرناتانت‌ها جمع‌آوری و با فیلتر استریل شدند [۳۲]. به ازای هر یک از ۵ سویه *لاکتوباسیل*، یک بلانک (شامل ml۵ محیط نوترینت برات و درصدی از محیط MRS برات معادل درصد سوپرناتانت)، یک شاهد (کنترل منفی)، یک نمونه با سوپرناتانت اسیدی و یک نمونه با سوپرناتانت خنثی در نظر گرفته شد. نمونه‌های خنثی و اسیدی هر یک شامل ml۵ محیط نوترینت برات، ۵، ۱۰ و ۱۵٪ از سوپرناتانت‌های سویه‌ها به صورت جداگانه و ۱٪ باکتری اندیکاتور (*سالمونلا تیفی‌موریوم* CFU/ml ۱×۱۰^۶) بود. در نهایت جذب نوری کنترل و نمونه‌های تیماری لوله‌های انکوبه‌شده (در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت)، در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۲۲].

بررسی اثر ضدباکتریایی توام: برای بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی مرزه یا شوید و سوپرناتانت خنثی *لاکتوباسیلوس پلانتروم* در شرایط آزمایشگاهی، MIC برای هر کدام از عصاره‌ها به نسبت ۲۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۸۰٪ با روش رقت در برات به دست آمد.

بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۴ و ۱۶۸ ساعت از تلقیح *سالمونلا تیفی‌موریوم* و انجام مراحل تیمار یک گرم از مدفوع نمونه‌ها در نرمال سالین استریل حل و یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون رقت‌های ۱:۱۰، ۱:۱۰۰، ۱:۱۰۰۰، ۱:۱۰۰۰۰ در محیط XLD کشت و پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوباتور در دمای ۳۷°C کلنی‌های رشد یافته بر حسب CFU/g اندازه‌گیری شد [۳۳].

یافته‌ها با نرم‌افزار SPSS 18 و آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه در سطح معنی‌داری ۰/۰۱ < p تحلیل شدند.

نتایج

در هیچ کدام از موش‌ها قبل از آزمایش عفونت به *سالمونلا تیفی‌موریوم* مشاهده نشد. عصاره‌های اتانولی گیاهان مورد استفاده

جدول ۲ تعداد کلونی‌های رشد کرده از *سالمونلا تیفی‌موریوم* در کشت مدفوعی موش‌های تیمار شده در گروه‌های مختلف در زمان‌های مختلف پس از ایجاد عفونت و دریافت تیمار بر حسب CFU/g

گروه	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت	۱۲۰ ساعت	۱۴۴ ساعت	۱۶۸ ساعت
II	(۸/۵±۱)×۱۰ ^۷	(۸/۲±۱)×۱۰ ^۷	(۶/۵±۰/۸)×۱۰ ^۷	(۴/۵±۰/۵)×۱۰ ^۷	(۴/۳±۰/۵)×۱۰ ^۷	(۴±۰/۸)×۱۰ ^۷	(۳/۸±۰/۷)×۱۰ ^۷
III	(۱/۹۶±۰/۵)×۱۰ ^۶	(۱/۰۵±۰/۹)×۱۰ ^۵	(۹±۱/۲)×۱۰ ^۴	(۸/۲±۱/۳)×۱۰ ^۴	(۴±۰/۷)×۱۰ ^۴	(۳±۰/۷)×۱۰ ^۴	(۲±۰/۹)×۱۰ ^۴
IV	(۴/۶±۰/۸)×۱۰ ^۷	(۲/۲±۰/۷)×۱۰ ^۷	(۵/۳±۱)×۱۰ ^۶	(۱/۸۶±۱/۳)×۱۰ ^۶	(۱/۲±۱/۱)×۱۰ ^۶	(۹±۰/۹)×۱۰ ^۵	(۳±۲/۲)×۱۰ ^۴
V	(۴/۲±۱/۲)×۱۰ ^۷	(۱/۹±۰/۹)×۱۰ ^۷	(۶/۵±۰/۸)×۱۰ ^۶	(۱/۵±۰/۷)×۱۰ ^۶	(۹±۰/۷)×۱۰ ^۵	(۶±۰/۹)×۱۰ ^۵	(۵±۰/۵)×۱۰ ^۵
VI	(۲±۰/۷)×۱۰ ^۵	(۹±۰/۷)×۱۰ ^۴	(۴±۱)×۱۰ ^۴	(۲±۱/۱)×۱۰ ^۴	(۱±۰/۹)×۱۰ ^۴	(۱±۰/۴)×۱۰ ^۴	(۹±۰/۴)×۱۰ ^۴
VII	(۱/۸±۰/۵)×۱۰ ^۷	(۱/۰۵±۰/۵)×۱۰ ^۷	(۵/۳±۱)×۱۰ ^۶	(۱/۲±۱/۱)×۱۰ ^۶	(۹/۵±۱/۲)×۱۰ ^۵	(۶/۵±۰/۷)×۱۰ ^۵	(۴/۵±۲)×۱۰ ^۴

می‌کنند کمتر است [۴۰].

پل و همکاران از اسانس‌های گیاهی به همراه نایسین و استرهای دی‌گلیسرید اسیدهای چرب برای مهار باکتری لیستریا منوسیترن استفاده نموده و بیان می‌کنند که می‌توان از نایسین و دی‌گلیسرول منولورات برای بالابردن اثر ضد لیستریایی ترکیبات گیاهی (کارواکرول، تیمول و اوژنول) استفاده نمود که در این حالت از مقدار (دوز) کمتری از اسانس گیاهی در ماده غذایی استفاده و در نتیجه از اثرات نامطلوب اسانس گیاهی روی طعم و مزه غذا جلوگیری شده است [۴۱]. نتایج بررسی چی‌ژانگ و همکاران مانند نتایج پل و همکاران نشان می‌دهد که استفاده توام از نایسین و کارواکرول به صورت سینرژسم باعث کاهش تعداد باکتری‌های زنده لیستریا منوسیترن و باسیلوس سرئوس می‌شود [۳۱].

میثاقی و همکاران نشان می‌دهند که اسانس آویشن شیرازی و نایسین هر کدام به تنهایی روی باسیلوس سرئوس موثر هستند ولی استفاده آنها توام، روی مهار باکتری حالت سینرژسم داشته و با کاهش درجه حرارت از ۳۰ به ۱۰ درجه سلسیوس، اثرات ضد میکروبی هر کدام به تنهایی یا توام افزایش می‌یابد [۲۲]. خنافری و همکاران با بررسی اثر ضد میکروبی رسوبات پروتئینی استخراج شده از باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس روتری، لاکتوباسیلوس رامنوسوس به این نتیجه رسیده‌اند که قطر هاله عدم رشد حاصل از این ترکیبات روی باکتری باسیلوس سرئوس، طی ۲۴ ساعت گرماگذاری، به ترتیب ۱۰، ۱۰ و ۱۱ میلی‌متر است. در نتایج به‌دست آمده از تحقیق محبوی و همکاران در رابطه با تاثیر ضد میکروبی رسوبات پروتئینی استخراج شده از باکتری انتروکوکوس فکالیس بر باکتری باسیلوس سرئوس، ۱۴ میلی‌متر گزارش شده است [۴۲].

لیفتیریس گزارش می‌کند که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مواد باکتریایی غیرباکتریوسین (ناشناخته و متفاوت با اسیدلاکتیک) تولید می‌کند که در شرایط آزمایشگاهی به گستردگی، مانع از رشد پاتوژن‌های گرم مثبت و گرم منفی مانند استفیلوکوکوس اورئوس، لیستریا منوسیترن، سالمونلا تیفی موریوم، شیگلا دیسانتره، کلبسیلا پنومونیا، سودوموناس آئروژینوزا و آنتروباکتریاسه می‌شود [۴۳].

مصرف سوپرناتانت خنثی پروبیوتیک در صورت ممانعت از رشد سوبه‌های باکتریایی، می‌تواند در ارتقای سطح سلامت میزان بسیار مفید باشد. ضمناً اگر به همراه سوپرناتانت خنثی پروبیوتیک، عصاره‌های الکلی مرزه و شوید استفاده شود، تاثیرات سینرژستی بین آنها موجب کاهش کلونیزاسیون باکتری می‌شود. نتایج حاصل از این آزمایش بسیار جالب توجه بود. این تحقیق مانند سایر تحقیقات صورت گرفته در این زمینه این نظر را قوت می‌دهد که به جای آنتی‌بیوتیک‌ها بهتر است از پروبیوتیک‌ها به همراه مکمل‌های درمانی از جمله عصاره گیاهان برای درمان عفونت‌های سالمونلایی

نتایج حاصل از مدل حیوانی با نتایج شرایط آزمایشگاه همخوانی داشت. موش‌هایی که با عصاره اتانولی مرزه به تنهایی و توام با سوپرناتانت خنثی لاکتوباسیلوس پلانتاروم تیمار شده بودند نسبت به موش‌هایی که با عصاره اتانولی شوید به تنهایی و توام با عصاره خنثی لاکتوباسیلوس پلانتاروم تیمار شده بودند و گروه کنترل، کاهش معنی‌داری در میزان دفع و کلونیزاسیون سالمونلا تیفی موریوم داشتند (جدول ۲).

بحث

پروبیوتیک‌ها میکروب‌های زنده‌ای هستند که در درمان و پیشگیری برخی از بیماری‌های عفونی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگر امکان استقرار آرگانسیم مفید و بی‌ضرر در دستگاه گوارش وجود داشته باشد، می‌توان به این طریق از کلونیزاسیون عفونت‌های میکروبی مختلف جلوگیری نمود [۳۴، ۳۵]. اغلب مطالعات نشان می‌دهند که لاکتوباسیلوس‌ها در پیشگیری و درمان اختلال‌های دستگاه گوارش نقش مثبت داشته و قدرت اتصال به سلول‌های اپیتلیال دستگاه گوارش انسان و حیوان را دارند [۳۶]. لاکتوباسیلوس کازئی سویه شیروتا (بالای ۳۰٪) روی اشریشیا کلی TG1، سالمونلا تیفی موریوم E10، اشریشیا کلی ATCC 1775 و سالمونلا تیفی موریوم ATCC 14028 بیشترین میزان مهار را دارد [۱۵]. هی‌من و همکاران نشان می‌دهند که در آلودگی موش‌ها با سویه اشریشیا کلی انتروتوکسوژنیک و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس موجب افزایش بقای موش‌ها می‌شود. همچنین استفاده پروبیوتیک مخلوط در غذاهای تخمیری، اثر حفاظتی بر موش‌های آلوده به اشریشیا کلی دارد و همزمان مدت عفونت نیز در موش‌ها کاهش می‌یابد [۳۷]. نتایج مطالعه دیگری که در آن موش‌ها از طریق دهان با سالمونلا تیفی موریوم آلوده شده‌اند، نشان می‌دهد که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس سویه LA₁ با داشتن یک عامل ضدباکتریایی به فاکتور حاضر در کشت سوپرناتانت باکتری‌های پروبیوتیک متصل می‌شوند. برخی از نتایج این مطالعه با تحقیق حاضر همخوانی دارد [۳۸]. اوگان‌بانوو و همکاران فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس برویس و تولید باکتریوسین لاکتوباسیلوس پلانتاروم را مورد بررسی قرار داده و با استفاده از روش چاهک نشان می‌دهند که این ۲ لاکتوباسیلوس از رشد اشریشیا کلی و باسیلوس سرئوس و یرسینیا انتروکولیتیکا جلوگیری می‌کنند [۳۹]. گون‌گونی‌یر و همکاران گزارش می‌کنند که مصرف محلول رویی کشت لاکتوباسیلوس فرمنتوم، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم اثر ضدباکتریایی روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی پاتوژن ایجاد می‌کنند [۲۳]. میزان کلی فرم‌ها در مدفوع موش‌هایی که از ماست حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس استفاده

studies conducted in humans. *Curr Pharm Des.* 2009;15(11):1428-518.

12- Kukkonen K, Savilahti E, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela, R, Poussa T. Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(1):192-8.

13- Raymond R. Adipic acid: Handbook of pharmaceutical. Excipients. 2009;1:11-2.

14- Ertesvag H, Valla S. Biosynthesis and applications of alginates. *Polym Degrad Stabil.* 1998;59:85-91.

15- Oyetayo VO, Oyetayo, FL. Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. *African J Biotech.* 2005;4(2):123-7.

16- Collins JK, Thornton G, Sullivan GO. Selection of probiotic strains for human applications. *Int Dairy J.* 1998;8:487-90.

17- Fooks LJ, Gibson GR. Probiotics as modulators of the gut flora. *Br J Nutr.* 2002;88(1):39-49.

18- Schuenzel KM, Harrison MA. Microbial antagonists of food borne pathogens on fresh, minimally processed vegetables. *J Food Protect.* 2002;65(12):1909-15.

19- Sefidkon F, Jamzad Z, Barazandeh M. Essential oil of *Satureja bachtiarica* Bunge: A potential source of carvacrol. *Iran J Med Aromat Plant.* 2005;20(4):425-39. [Persian]

20- Abbasi KH, Sefidkon F, Yamini Y. Comparison of oil content and composition of two *Satureja* species (*Satureja hortensis* L. and *Satureja rechingeri* Jamzad) by hydrodistillation and supercritical fluid extraction. *Iran J Med Aromat Plant.* 2005;21(3):307-18. [Persian]

21- Singh G, Maurya S, Catalan C. Chemical constituent's antimicrobial investigations and antioxidant potentials of *Anethum graveolens* essential oil and acetone extract. *J Food Sci.* 2005;70(4):208-15.

22- Misaghi A, Basti AA. Effect of *Zataria multiflora* Boiss: Essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. *Food Control.* 2007;1(9):1043-9.

23- Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude AA. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* Fl and *Lactobacillus brevis* OGI. *Afr J Biotechnol.* 2003;2(8):219-27.

24- Mahboubi M, Haghi G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J Ethnopharmacol.* 2008;119(2):325-7.

25- Delaquis PJ, Stanich B, Mazza A, Girard G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int J Food Microbiol.* 2002;74(1-2):101-9.

26- Bahramikia S, Yazdanparast R. Antioxidant and free radical scavenging activities of different fractions of *Anethum graveolens* leaves using in vitro models. *Pharmacol Online.* 2008;2:233-19.

27- Coconnier MH, Lievin V, Hemery E, Servin AL. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(11):4537-80.

28- Young-Hyo C, Jong-Keun K, Hong-Joong K, Won-Yong K, Young-Bae K, Yong-Ha P. Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent in vivo studies. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2001;80:193-9.

29- Ziemer CJ, Gibson GR. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: Perspectives and future strategies. *J Dairy Sci.* 1998;8(5-6):473-9.

30- Hagiwara M, Kataoka K, Arimochi H, Kuwahara T, Nakayama H, Ohnishi Y. Inhibitory effect of fluvastatin on ileal ulcer formation in rats induced by nonsteroidal anti-inflammatory drug. *World J Gastroenterol.*

استفاده شود. همچنین عصاره گیاهان و سوپرناتانت پروبیوتیک به‌تنهایی اثر ضدباکتریایی در سویه *سالمونلا تیفی* موربیوم ATCC ۱۴۰۲۸ داشت ولی نسبت به مدل استفاده توام اختلاف چشم‌گیری نشان داد و بهترین نسبت مخلوط بین عصاره پروبیوتیک و عصاره گیاهان مورد آزمایش، ۵۰:۵۰ بود. اثر هم‌افزایی عصاره خنثی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به همراه عصاره اتانولی مرزه به عنوان کاندیدای احتمالی در ساخت داروهای ترکیبی علیه *سالمونلا تیفی* موربیوم معرفی می‌شود.

نتیجه‌گیری

ترکیب توام سوپرناتانت خنثی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و عصاره اتانولی گیاه مرزه باعث کاهش میزان کلونیزاسیون *سالمونلا تیفی* موربیوم می‌شود.

تشکر و قدردانی: مقاله حاضر بخشی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد است و نویسندگان بر خود لازم می‌دانند تا از همکاران مرکز تحقیقات زیست‌شناسی زنجان تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1- Talan D, Moran GJ. Etiology of bloody diarrhea among patients presenting to United States emergency departments: Prevalence of *Escherichia coli* O 157: H7 and other enteropathogens. *Clin Infect Dis.* 2001;32(4):573.

2- Ray SM, Ahuga SD. Population, based, surveillance for yersinia enterocolitica infections in food net-sites, 1996-1999: Higher risk of disease in infants and minority populations. *Clin Infect Dis.* 2004;38(13):5181.

3- Cetinkaya F, Cibik R, Soyutemiz GE, Ozakin C, Kayali R, Levent B. Shigella and Salmonella contamination in various foodstuffs in Turkey. *Food Control.* 2007;19(11):1059-63.

4- Weiss SH, Blaser MJ. Occurrence and distribution of serotypes of the Arizona subgroup of *Salmonella* strain in the United States from 1967 to 1976. *J Clin Microbiol.* 1986;23(6):1056-64.

5- Schrezenmeier J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics and synbiotics approaching a definition. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(2):361-4.

6- Oyetayo VO, Oyetayo FL. Review potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. *Afr J Biotechnol.* 2005;4(2):123-7.

7- Kandler O. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 1989.

8- Rafter J. The effects of probiotics on colon cancer development. *Nutr Res Rev.* 2004;17(2):277-84.

9- Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Aguero G, Gobatto N. Immune system stimulation by probiotics. *J Dairy Sci.* 1995;78(7):1597-606.

10- Parves S, Malik KA, Kang A, Kim HY. Probiotic and fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol.* 2006;100(6):1171-85.

11- Lomax AR, Calder PC. Probiotics, immune function, infection and inflammation: A review of the evidence from

- هم‌افزایی اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس پلانتاروم با عصاره‌های مرزه و شوید بر سالمونلا تیپ‌ی موریم: در شیشه و در مدل حیوانی ۹۵
- they affect intestinal pathophysiology. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:1151-65.
- 38- Lefteris M, Luc DV. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by Bifidobacteria is caused by the production of organic acid. *Int Dairy J.* 2004;16(9):1049-57.
- 39- Bodana AR, Rao DR. Antimutagenic activity of milk fermented by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus*. *J Dairy Sci.* 1990;73:3379-84.
- 40- Akalin As, Gonc S, Duzel S. Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol levels in mice. *J Dairy Sci.* 1997;80(11):2721-5.
- 41- Pol IE, Krommer J, Smid EJ. Bioenergetics consequences of nisin combined with caracole towards *Bacillus cereus*. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2002;3(1):55-61.
- 42- Khanafari A, Hosseini F. Practical microbiology and biochemical principles of reactions. Tehran: Poorsina Publication; 2009. [Persian]
- 43- Lefteris M, Luc DV. The in vivo inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by Bifidobacteria is caused by the production of organic acid. *Int Dairy J.* 2006;16(9):1049-57.
- 2005;11(7):1040-3.
- 31- Chi-Zhang Y, Yam K, Chikindas MS. Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. *Int J Food Microbiol.* 2004;90(1):15-22.
- 32- Tajabady EM, Hejazi MA, Noohi A. Study on probiotic properties of *Lactobacillus* isolated from traditional dairy products of Lighvan. *Q J Sci Tarbiat Moallem Univ.* 2008;7(3):941-52. [Persian]
- 33- Hatha AAM. Antimicrobial activity of some of south-Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*. *Braz J Microbiol.* 2006;37(2):1-2.
- 34- Selander RK, Smith NH. Molecular population genetics of *Salmonella*. *Rev Med Microbiol.* 1990;1:219-28.
- 35- de Roos NK, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism and carcinogenesis: A review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(2):405-11.
- 36- Cowden JM, Lynch D. Case-control study of infections with *Salmonella enteritidis* phage type 4 in England. *Br Med J.* 1989;299:771-3.
- 37- Heyman M, Menard S. Probiotic microorganism: How